

## PERIFÉRIÁS ÉS CENTRÁLIS RECEPTOROK RÉSZVÉTELE OPIOIDOK FÁJDALOMCSILLAPÍTÓ HATÁSÁBAN ÉS MELLÉKHATÁS SPEKTRUMÁBAN. KORAI DROG EXPOZÍCIÓ (PERINATÁLIS ÉS ADOLESZCENZS) HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PATKÁNYON

**I. Perifériás és centrális receptorok részvétele opioidok fájdalomcsillapító hatásában és mellékhatás spektrumában.** A napi klinikai gyakorlat számára a fájdalom farmakoterápiájának biztonságos megoldása sürgető és releváns igény. Ismeretes a morfinszármazékok kivételes szerepe a fájdalom csillapításában, azonban veszélyes mellékhatásaik (pl. légzésdepresszió, euforia, és a következményes dependenciához vezető abúzus potenciál) korlátozzák mindennapi biztonságos használatukat. E vegyületek fő-, és mellékhatásait elsősorban a  $\mu$ -opioid receptorok közvetítik, amelyek jelenléte a nociceptív pálya valamennyi szintjén meggyőzően bizonyított (Gyires és Fürst, 2011; Pub. lista; PL 57). A centrális mellékhatások kizárására az egyik lehetőség a molekulák hatásspektrumának receptorális szintű befolyásolása (pl. kevert agonista-antagonista típusú szerek, nem opioid receptorok kontribúciója), a másik lehetőség a centrális támadáspont elkerülése a vegyületek kémiai szerkezetének manipulációja útján. A kezdetben nagyon ígéretes, az agyba rosszul penetráló opioid peptidek szintézise nem hozta meg a várt eredményeket, mert instabilak, és fájdalomcsillapító hatásuk gyenge (McNally és Akil, 2002). A kutatások világszerte arra irányulnak, hogy mellékhatásmentes, mégis potens peptid-, peptidomimetikus ill. heterociklikus opioid származékokat állítsanak elő. Kevés olyan kutatás ismert, amelyben a  $\mu$ -opioid receptor sűrűségben jelentősen különböző szupraspinális, spinális ill. perifériás támadáspontok relatív kontribúcióját - amely jelentősen különbözhet a vegyületek kémiai és farmakodinamiás karakterétől (hidrofil vagy lipofil természet, "intrinsic efficacy" stb.) függően - szisztémás kezelés mellett vizsgálják. Ezért terveztük a pályázat keretében e téren folytatni kutatásainkat.

Kutatócsoportunk figyelme elsősorban heterociklikus vegyületek (Schmidhammer, 1998; Greiner et al., 2003) perifériás hatás-szerkezeti összefüggéseinek feltárására irányult. Az oxymorfon különböző származékait már korábban (Fürst et al. 1993) kollaborációban kutattuk, majd egy sikeresen lezárt EU-5 pályázat keretében publikáltuk (Spetea et al. 2004; Fürst, et al. 2005). Felismertük, hogy aminosav szubsztitúció a morfinstruktúra C-6 pozíciójában olyan ionizálható vegyületeket eredményez, amelyek nehezen penetrálnak a központi idegrendszerbe. *Ezért, hipotézisünk szerint, amennyiben fájdalomcsillapító hatásuk kimutatható, ez perifériás opioid receptorok közvetítésével jöhet létre, továbbá, hogy ezen származékok nem - vagy csak kevésbé – idéznek elő centrális mellékhatásokat.* Jelen munkáinkban Schmidhammer és munkacsoportja (Innsbrucki Egyetem) által előállított újabb aminosavakkal szubsztituált vegyületekkel (8 db 14-fenilpropoxymorfinszármazék 1063-1081 kódszámok), a már közölt (Fürst et al. 2005) hatékony, preferáltan perifériás támadáspontú 6-glicin-14-O-metiloxymorfon 7 észterszármazékával (729-1083 kódszámok), ill. 4 különböző 6-guanidinoszármazékkal (940, 943, 721, 724 kódszámok) végeztük kísérleteinket. (Ezen vegyületek egy része szabadalmi okokból nem közölhető). Továbbá, újabb kooperációban (Noszál B. és munkacsoportja, Semmelweis Egyetem, GYK) vizsgáltuk a C-6 szulfát szubsztitúció jelentőségét 14-szubsztituált agonisták (morfin és kodein származékok) ill. antagonisták (naloxon ill. naltrexon) esetében (8 vegyület). A morfinstruktúra C-14, és C-6, valamint a 17-N pozíciójában individuális ill. szimultán végrehajtott szubsztitúciók következményeit tanulmányoztuk a molekulák farmakológiai hatásspektrumára. Opioid peptidek közül az endomorfín-2 származékait vizsgáltuk. Kísérleteinkben a referens  $\mu$  agonista DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, N-Me-Phe<sup>4</sup>, Gly<sup>5</sup>-ol] enkephalin), delta agonista DPDP (D-

Pen<sup>2,5</sup>-enkephalin), ill.  $\mu$  antagonista CTAP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) és delta antagonista TIPPsz (cha-TIPP $\psi$  (cyclohexyl-Ala-Tic $\psi$ -Phe-Phe-OH) peptidek hatásait vizsgáltuk. A pályázati periódusban *in vitro* biokémiai módszerek (receptorkötés), elektrofiziológiai technikák (heterogén opioid receptorkészlettel rendelkező izolált szervek: egér/patkány izolált vas deferens: MVD/RVD; receptor konstansok-, affinitás és intrinsic aktivitás meghatározása) ill. *in vivo* módszerek (fájdalomcsillapító hatás, viselkedésfarmakológiai tesztek, tolerancia-dependencia) alkalmazásával végeztünk vizsgálatokat, elsősorban a lehetséges perifériás támadáspont tisztázása céljából. Vizsgáltuk opioidok hő-, kémiai (viscerális) ill. gyulladásos stimuluson alapuló fájdalomcsillapító hatásának támadáspontját szubkután (sc), intracerebroventrikuláris (icv), spinális (it), valamint perifériás (intraplantar, i.pl.) adagolással, patkány tail flick (RTF), egér-patkány writhing, ill. a gyulladásos Freund's complete adjuvant teszten, a receptor szelektivitást specifikus ( $\mu$ , kappa, delta) opioid antagonistákkal, a perifériás hatást tercier-, quaterner-, ill. peptid természetű opioid antagonisták segítségével jellemeztük.

A morfinstruktúra 6-os pozíciójában aminosavval szubsztituált oxymorfon származékok túlnyomó többsége a  $\mu$ ,  $\delta$ , és  $\kappa$  opioid receptorkészlettel rendelkező MVD-n nagy affinitással kötődik a  $\mu$  receptoraltípushoz, kivéve a 6-glicin és 14-fenilpropoxy szubsztituált származékokat, (PL. 11, 59) amelyek kevésbé szelektívek, l. lejjebb). Vizsgáltuk továbbá ezen vegyületek agonista, antagonista ill. parciális agonista karakterét. RVD modellen kidolgoztunk egy egyszerű, prediktív értékű módszert opioidok intrinsic efficacy-jának (hatáserősségének) értékelésére (PL 49). Az általunk alkalmazott, *heterociklikus* szelektív  $\mu$  agonisták a (14-metiloxymorfon ill. a 14-metoxymetopon) hatását az anyavegyület oxymorfon, ill. morfin, valamint az ugyancsak szelektív  $\mu$  agonista *peptid* a DAMGO, hatásaival hasonlítottuk össze. Kötési tesztben, a két C-14 szubsztituált származék affinitása rácsálók agyi  $\mu$  receptoraihoz jelentősen megnőtt, az anyavegyülethez viszonyítva. Izolált szerveken 3-10x bizonyultak hatékonyabbnak, mint a DAMGO. Eredeti felismerésünk volt, hogy míg a tesztvegyületek és a DAMGO >70% gátlást értek el MVD preparátumon, a morfin és oxymorfon jóval gyengébb agonistának mutatkoztak, ugyanakkor RVD preparátumon – amelynek  $\mu$  receptor készlete lényegesen kisebb, mint a MVD-é – a két 14-szubsztituált vegyület ill. a DAMGO szintén >70 %-os gátlást ért el, míg a morfin és az oxymorfon igen gyenge gátlószerek, (18% ill. 4 % gátlás). A C-14 szubsztitúció növeli a vegyületek intrinsic efficacy-ját, full  $\mu$  agonista karakterét. Bizonyítottuk, hogy a RVD és a MVD  $\mu$  receptorkészlete azonos karakterű, mivel a  $\mu$  antagonista naltrexon K<sub>e</sub> értékei DAMGO ellen nem különböztek a két preparátumon. (PL.11, 49). Fenti eredményeink alapján a RVD jóval relevánsabb alternatíva lehet az intrinsic efficacy (a várható perifériás hatékonyság markere) meghatározására, mint a bonyolultabb és kevésbé fiziológias körülmények között kivitelezett [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötési teszt.

Újabb bizonyítékokat nyertünk az oximorfon származékok  $\mu$  receptor szenzitív antinociceptív hatásának perifériás jellegére (PL 1, 2, 7, 11, 24, 29, 40, 52, 59). A vér-agy gátat rosszul passzáló glicinnel szubsztituált modellmolekula jelentős fájdalomcsillapító hatást fejt ki, mind sc mind icv adagolásnál egéren, a viscerális fájdalom modellen is. A perifériás támadáspontot bizonyítja az agyba rosszul penetráló opioid antagonista a CTAP gátló hatása a modellmolekula, ill. a szintén limitáltan penetráló DAMGO ellen, míg hatástalansága a főleg centrálisan ható morfin ellen (PL. 11, 12). Egy másik kísérletsorozatban 17-N-metil-, ill. N-ciklopropilmetil (CPM) morfinánok újonnan szintetizált 6-glicin és 14-fenilpropoxy szubsztituált származékairól receptorkötési tesztben kimutattuk, hogy a 14-fenilpropoxymorfinánok affinitása nőtt a 14-metoxi szubsztituáltakhoz viszonyítva, azonban szelektivitásuk módosult: kötődésük mértéke a - $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  -opioid receptorokhoz hasonló. A G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozó opioid receptorok stimulációját radioaktívan jelzett [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S kötéssel lehet meghatározni. Agonista hatására a receptor aktiválódik,

GTP $\gamma$ S kötődik hozzá, azonban a GTP-vel ellentétben hidrolízis nem következik be, a receptor stimulált állapotban marad. [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kötés segítségével kimutattuk, hogy a két N-CPM vegyület parciális agonista, nemcsak a  $\mu$ , hanem a többi opioid receptoron is. A vizsgált vegyületek ebben a csoportban 17-226 -szor erősebb antinociceptív hatással rendelkeznek, mint a morfin, RTF teszten mérve. E munkák során érdekes, új hatás -szerkezeti összefüggést ismertünk fel: a potens, tiszta antagonistá naloxon és naltrexon 14 pozíciójának fenilpropoxy szubsztitúciója - erős agonista- azaz analgetikus- hatást eredményezett (PL. 59). Amint az irodalomból jól ismert) a N-CPM ill. N-allil szubsztitúció legtöbbször antagonistá hatású szerekhez vezet (Casy és Parfitt, 1986; Schütz et. al 2003; PL 31, Gyires és Fürst, 2011) bár vannak arra is példák, hogy agonista karaktert kölcsönöz a vegyületnek (PL. 31). Jelen vizsgálatban az N-CPM szubsztituált vegyületek jelentős analgetikus (agonista) hatását figyeltük meg gyulladáso - carrageenan hiperalgézia- teszten is. Kvaterner naloxonnal bizonyítottuk, hogy a mért hatás elsősorban perifériás opioid receptorok közvetítésével jön létre (PL. 59). A vegyületek penetrációs képességét a centrális (icv) ill. perifériás (sc) hatékonysági arányok meghatározásával jellemeztük: ez pl. a referens fentanyl esetében 23 (Fürst et al. 2005). Fenti molekulák többségében az sc/icv hatékonysági arányt 40- 400 között határoztuk meg. Minél kisebb ez az arány, annál jobban penetrál a vegyület. A jelentős különbség az sc/icv medián analgetikus dózisok között arra utal, hogy ezek a vegyületek szisztémás adagolásnál vagy egyáltalán nem jutnak be az agyba, vagy csak igen kis hányaduk képes penetrálni, ezért valószínűsíthető, hogy fájdalomcsillapító hatásuk elsősorban perifériás (feltételezhetően a szenzoros neuronokon elhelyezkedő) opioid  $\mu$  receptorok közvetítésével jön létre. A perifériás támadáspont további igazolásának tekintettük a szisztémásan adott, rosszul penetráló antagonisták (kvaterner naloxon, CTAP) hatékonyságát (PL. 11, 12, 24, 59). Az endomorfín-2 (H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) a közelmúltban felfedezett hatásos, szelektív  $\mu$  agonista peptid (Zadina, 1997). Újonnan szintetizált endomorfín-2 spiro-analógjairól molecular modeling segítségével, ill. izolált MVD preparátumon demonstráltuk, hogy e származékok potens és szelektív  $\mu$  agonisták/parciális agonisták. Ezen pszeudopeptidek jelentősége továbbá, hogy felismerve a peptidváz flexibilitásának jelentőségét a  $\mu$  receptor szelektivitásban az (oldalláncokon kívül), megengedi a  $\mu$  receptor- $\mu$  ligand interakció vizsgálatának új dimenzióját (PL. 39).

A mellékhatások közül a legfontosabb -légzéssuppresszió, obstipáció, fizikális dependenciá-jelenségeket vizsgáltuk (eredmények publikációra előkészítve). A légzésre gyakorolt hatásokat altatott patkányon a légzési amplitúdó, frekvencia valamint a vérgázok (O<sub>2</sub> ill. CO<sub>2</sub>) és a PH változásaival jellemeztük, fentanylhoz és morfinhoz hasonlítottuk. Megállapítottuk, hogy a néhány kiválasztott hatékony 6-glicin származék terápiás indexe (halálos légzéssuppressziót okozó dózis/analgetikus dózis ) lényegesen kedvezőbb, mint a fentanyllé ill. a morfiné. Hasonló eredményre jutottak más szerzők, a hasonló szerkezetű 14-metoxymetoponnal végezve kísérleteiket, kutyán (Freye et al. 2000). A centrálisan és perifériásan regulált *gastrointesztinális* motilitást (charcoal teszt, egéren és patkányon) a tesztvegyületek és a morfin ekvianalgetikus dózisban gátolták. A fájdalomcsillapító hatáshoz (RTF) kialakuló *toleranciát* patkányon értékeltük, többféle adagolási séma (kisebb ill. nagyobb dózisok konstans, ill. folyamatosan emelkedő dózisok) alkalmazásával. Kiszámítottuk a dose-ratio-kat (DR: fájdalomcsillapító ED<sub>50</sub> kezelt/ ED<sub>50</sub> naiv állat). egállapítottuk, hogy a tolerancia alakulásának idő függése és mértéke a morfinhoz hasonló. A *fizikális* dependenciá modelljét (Saelens féle ugrás- teszt, egér) alkalmaztuk, morfinszármazékok konstans ekvianalgetikus dózisaival 7 alkalommal kezelt állatokon. Megállapítottuk, hogy a parciálisan perifériás támadáspontú új vegyületek a morfinhoz hasonló fizikális dependenciát okoznak. Érdekes módon a *pszichés dependenciá* (az abúzus motiváció) modelljén a conditioned place preference teszten (CPP) a néhány kiválasztott 6-aminósav szubsztituált származék morfintól eltérően – terápiás adagban nem váltott ki

helypreferenciát, csak ennek többszörösének megfelelő dózisban, ami szintén a limitált centrális hatékonyságra utal. Az opioid típusú tolerancia kialakulásának *mechanizmusait* kutattuk a Bolognai Egyetem Farmakológia és Farmakognózia tanszékével (P. Romualdi és munkacsoportja) kollaborációban. A prodynorfin génexpresszió és a dinorfin szint változását vizsgáltuk opioidokkal krónikusan kezelt patkányokon a dependenciáért/toleranciáért felelős különböző agyi régiókban (N. accumbens, striátum, hippocampus, hypothalamus). Megállapítottuk, hogy az agyi dinorfinerg rendszer szerepet játszik az opioid tolerancia kialakulásában. Két általunk vizsgált, redukált deszenzitizációt kiváltó származék morfintól eltérően befolyásolta a prodynorfin génexpressziót (PL. 5). A delta opioid receptorok szerepe a fájdalomcsillapításban és az opioid tolerancia kifejlődésében kevésbé tisztázott. Delta receptor ligandok morfin-toleráns egérnek it adagolva eltérően befolyásolták a mű agonista DAMGO fájdalomcsillapító hatását, míg naív egérben nem volt ilyen hatásuk. A delta<sub>1</sub> agonista DPDP gátolta, a delta<sub>2</sub> agonista deltorphin II nem befolyásolta, míg a delta antagonistá TIPPsi potenciózta DAMGO fájdalomcsillapító hatását. Feltételeztük, hogy  $\mu$  és a delta receptorok interakciója áll a hatás hátterében, s lehetséges, hogy a DPDP facilitálja delta/ $\mu$  receptor dimerek képződését, (azaz virtuálisan „down regulálja” a  $\mu$  receptorokat), és ezért gátolja DAMGO hatását. Azok a ligandok, amelyek nem módosítják a fájdalomcsillapító hatást, feltehetően nem befolyásolják a dimer képződést, de azok a szerek, amelyek képesek szétkapcsolni a dimereket, csökkenthetik a  $\mu$  agonistához kialakult spinális toleranciát. Patkányon mind a kontroll, mind a morfin toleráns csoportban a delta ligandok (naltrindol kivételével) potenciózták (2-5 szörös érték) DAMGO hatását. A morfin toleráns csoportban visszaállították DAMGO hatását a naív kontrollokon mért szintre. Kísérleteink arra utalnak, hogy a delta opioid ligandok másképpen viselkednek egéren, mint patkányon. Egyik lehetséges magyarázat, hogy patkányon eleve nagyobb a  $\mu$ /delta dimer komplexek sűrűsége. A naltrindol gátló hatása DPDP fájdalomcsillapító hatására magyarázható azzal hogy a peptid  $\mu$ /delta szelektivitása viszonylagos (PL. 42, 48). E teoria vizsgálatára terveink között szerepel [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S GTP-gamma-S kötési kísérletek végzése naív és morfintoleráns egerek agy és gerincvelő homogenizátumain. Egy másik hasonló kísérletsorozatban patkányokon morfin toleranciát váltottunk ki. Ezeken az állatokon a DAMGO fájdalomcsillapító hatásának a kontrollokhöz viszonyított 3-6 szoros gyengülését figyeltük meg (kereszt tolerancia). Ezzel párhuzamosan MVD-n vizsgáltuk a TIPPsi és a szelektív mű antagonistá peptid CTAP affinitását a delta, illetve a mű receptorhoz. A TIPPpsi K<sub>e</sub> értéke DPDPE ellen 1,37 nM., a CTAP K<sub>e</sub> értéke pedig DAMGO ellen 34,25 nM. Megállapítottuk, hogy a TIPPpsi (peptid opioid delta antagonistá) DAMGO potenciózó hatása dózisfüggő. 1 nmol/állat TIPPpsi potenciózta a DAMGO hatását naív patkányban (ED<sub>50</sub>: 35,7 pmol/állat vs. 13,4 pmol/állat), míg a 0,1 nmol/állat koncentrációban nem befolyásolta. A TIPPpsi potenciózó hatása dózisfüggő, bár a hatásos koncentráció igen nagy. In vitro a TIPPpsi delta affinitása 20x nagyobb, mint a CTAP mű affinitása, viszont a CTAP-nak a DAMGO antinociceptív hatását gátló dózisa mindössze 15 pmol/állat. Az adatokból valószínűsíthető, hogy a TIPPpsi nem a delta receptor monomerhez kötődik, hanem más struktúrához, amely lehet mű-delta dimer is (Ezen munkák előadásra és közlésre előkészítve).

*A fájdalom mechanizmusok és az endogén opioid rendszer kapcsolatát perifériás, gyulladásos fájdalom modellen (Freund's adjuvant teszt) ill. stressz (erőltetett hidegvízben úszás) helyzetben vizsgáltuk. Ilyen körülmények között a szenzoros neuronok opioid receptorai aktiválódnak, ez pedig a lokális (perifériás) gyulladásos fájdalom mérséklődéséhez vezet. Az opioid peptidek ilyenkor a PMN leukocytaiból szabadulnak fel, amelyek a gyulladásos szövet intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM) expressziójának következtében csoportosulnak a gyulladás helyén. A berlini Charité Egyetem Aneszteziológia tanszékével - M. Schäfer és C. Stein munkacsoportjával együttműködve - akiknek nevéhez fűződik a perifériás opioid*

fájdalomcsillapítás a Nature-ben publikált (Stein et al. 2003) eredeti gondolata- közös cikkben (PL. 50) számoltunk be e munkánkról. Vizsgáltuk a perifériás és a szimpatikus idegrendszer szerepét az ICAM fokozott expressziójában. Ezen idegek szelektív kémiai destrukciója (capsaicinnel ill. 6-OH dopaminnal) csökkenti a PMN leukocyták migrációját, az endogén opioid peptidok és az ICAM felszabadulását, és az i.pl. adott Freund's adjuváns okozta fájdalomra gyakorolt gátló hatást. Eredményeink újabb bizonyítékát adják a perifériás idegrendszer és az immunrendszer szoros kapcsolatának, gyulladásos, perifériás fájdalomban. In vivo eredményeink kiegészítésére a  $\mu$ -opioid receptorok sűrűségének kvantitatív analízise céljából immunohisztokémiai méréseket és receptorkötési vizsgálatokat is végeztünk (PL 50).E kísérleti elrendezésben saját perifériásan ható vegyületeink vizsgálata és közlésre előkészítése folyamatban van.

(Néhány egyéb mechanizmusra vonatkozó, nem tervezett vizsgálatunkat előzetesnek tekintjük, folytatásuk, kiegészítésük várható a jövőben: PL. 10, 27, 28, 30, 41).

A *cannabinoid és opioid* rendszer kölcsönhatását ismételt, emelkedő dózisú morfin adagolásával dependenssé tett egereken vizsgáltuk. Nagyméretű open field arénában vizsgálva dependens állatokon a naloxon (1 mg/kg ip) adagolása a lokomotoros aktivitást szignifikánsan csökkenti. A naloxon-indukálta lokomoció csökkenést akutan, 20 perccel a naloxon előtt alkalmazva, sem a CB1/CB2 agonista 2-AG (2-arachidonylglycerol, 10 mg/kg ip.), sem a CB1 antagonist SR141716 (5 mg/kg ip.) vegyület nem befolyásolta. CB1 knock out egereken kimutattuk, hogy egér writhing teszten, a vonaglások száma a kontrollokéhoz hasonlítva szignifikánsan csökkent. A cannabinoid opioid interakciót ezeken az egereken vizsgálva megállapítottuk, hogy morfin fájdalomcsillapító hatása iránti érzékenységük jelentősen megnövekedett, ill. hogy a neuroprotekción perifériás mechanizmusai, a gyomor mucosa védelemben szerepe lehet ennek az interakciónak (PL. 3,6 ). (A kísérletek folytatása, közlésre előkészítés folyamatban). Az opioidok ill. a cannabinoidok sokszor hasonló farmakológiai hatásainak közvetítésében jelentős szerepet töltenek be egyes magasabb rendű neuronális struktúrák, mint pl. az ilyen szempontból kevésbé vizsgált locus coeruleus (LC), amely résztvesz a leszálló fájdalomgátló pálya szabályozásában, ill. a striatum, amely a mozgáskoordinációban betöltött alapvető szerepe miatt e vegyületek mellékhatásaiban játszhat szerepet. A LC területén a noradrenerg neuronokat farmakológiailag, a striatum medium spiny interneuronjait vizuálisan azonosítottuk. Voltage clamp whole cell technikával 8-14 napos patkányokból készített agyszeleteken dolgoztunk. Mindkét területen a spontán excitátoros áramokat regisztráltuk (sEPSC), amelyek glutamát felszabadulás következtében jönnek létre. A GABAerg komponenst bicucullin segítségével kiiktattuk. A CB1 cannabinoid ligand WIN 55,212–2 mellett megvizsgáltuk a nocicepcióval kapcsolatban szintén intenzív figyelemre számot tartó capsaicin hatásait is a fenti struktúrákon (A kísérletek egy része még kiértékelés és közlés alatt áll, mivel a portugál kooperációs partner hisztokémiai mérései folyamatban vannak). A LC kísérletekben capsaicin 10  $\mu$ M-os koncentrációban a sEPSC-k frekvenciáját robosztus mértékben, tartósan (deszenzitizáció nélkül) fokozta, miközben az amplitúdóját nem befolyásolta. Ez a hatás elsősorban a glutamát felszabadulás erőteljes fokozását jelenti (preszinaptikus hatás), míg az amplitúdóra kifejtett hatás hiánya azt mutatja, hogy posztiszinaptikusan nem történt érdemi interakció. A CB1 ligand WIN 55,212–2 alkalmazásakor a tendencia preszinaptikus gátló jellegű hatásokra utal. A striatum esetében a capsaicin 10  $\mu$ M koncentrációban hatástalan volt, azonban kis, 0,1-1  $\mu$ M-os, koncentrációban átmeneti, szignifikáns preszinaptikus serkentő hatást produkált, amely gyors deszenzitizációt mutatott. Ezek a hatások capsazepinnel teljes mértékben antagonizálhatók voltak. (A két hatásban mutatkozó különbséget mindenképpen tovább szeretnénk tanulmányozni, megtalálni az okokat arra, hogy a gyorsan deszenzitizálódó TRPV1 receptor miként képes egy tartós erőteljes hatást kifejteni a locus coeruleusban). A WIN 55,212–2 szignifikáns mértékben

csökkentette a striatumban az sEPSC frekvenciát, míg nem befolyásolta az amplitudót, amely a vegyület glutamát felszabadulást gátló hatására utal.

Mivel a fájdalompálya fontos eleme a hátsógyöki ganglion (DRG) szenzoros neuronja, tanulmányozásával közelebb juthatunk a perifériás mechanizmusok megértéséhez. Ez a preparátum lehetővé teszi más, nem opioid receptorok esetleges szerepének feltárását is. Whole-cell patch-clamp méréseket végeztünk, és azt tanulmányoztuk, hogy egy kiválasztott és korábban publikált (Spetea et al. et al. 2004, Fürst et al. 2005) 6-os pozícióban aminosavval szubsztituált morfinszármazék a morfinhoz képest milyen hatást fejt ki a hátsó gyöki ganglion-sejttenyészet neuronjainak ionotrop receptoraira. Kísérleteink ezen szakaszában elsősorban a P2X3 receptor funkciót tanulmányoztuk. Azt tapasztaltuk, hogy a receptor agonista  $\alpha,\beta$ -methylen ATP által kiváltott áramokat a morfin, 10  $\mu$ M-os koncentrációban  $37,9 \pm 14,5$  százalékban gátolta. Ehhez képest a 6-aminosav-szubsztituált származék lényegesen kisebb koncentrációban, már 0,1  $\mu$ M-os koncentrációban igen erőteljes,  $45,9 \pm 10,6$  százalékos gátló hatást fejtett ki a P2X3 receptor funkcióra. Míg a morfin hatása közel teljes mértékben reverzibilisnek bizonyult 5 perc után, addig a hidrofil származék gátló hatása sokkal tartósabban fennmaradt. Mindezek az eredmények egyértelműen a vegyület perifériás hatékonysága mellett szólnak és jó összhangban vannak tartós, perifériásnak minősíthető analgetikus hatásukkal kapcsolatos korábbi megfigyeléseinkkel (Fürst, et al. 2005; PL. 11).

## ***II. Korai drog expozíció (perinatális és adolescensz) hatásának vizsgálata patkányon***

Viselkedésfarmakológiai vizsgálatokat folytattunk patkányokon, a perinatalisan (gesztációs és laktációs periódus) morfin ill. a pszichostimuláns ecstasy (3,4-metiléndioximetamfetamin, MDMA) expozíciónak kitett anyák adolescensz korú (PD28-42) utódain. Megállapítottuk, hogy az utódok *születési súlya* mindkét nemből csökkent a kontroll csoporthoz képest, majd ez a különbség a morfin-expozíciónak kitett utódállatok esetében eltűnt, a morfin kezelt anyák utódainak testsúly növekedése a következő 2 hétben szignifikánsan nagyobb volt, mint a kontrolloké. Míg a morfin-expozíció befejeződése (azaz a leválasztás) után 2 nappal (PD23) mérve az utódállatok kereső-kutató *lokomotoros* aktivitása nem változott, adaptációs képességük az új környezetben szignifikánsan csökkent. Az emelt keresztpalló *tesztben* (*anxiétás* modell) nem mutattunk ki szignifikáns eltérést a két csoport között, azonban az erőltetett úszás teszten a morfin expozíciónak kitett állatok depresszió-szerű viselkedést mutattak, továbbá nyugalmi *ACTH* és *kortikoszteron* szintjük alacsonyabb volt, és a stressz hatására bekövetkező emelkedés is elmaradt a kontroll csoporthoz viszonyítva. Kimutattuk, hogy krónikus MDMA kezelés, morfintól eltérően növelte az amiloid prekursor protein (APP) mRNA szintet és csökkentette a szolubilis APP szintet patkány agyban, amely a neuronális sejtek degenerációját feltételező folyamat. (PL.18). A perinatalisan ecstasy-val kezelt anyák utódainak születési súlya mindkét nemből csökkent a kontroll csoporthoz képest és ez a különbség tartósan (még felnőtt korban is) fennmaradt. Kereső-kutató lokomotoros aktivitásuk, viselkedésük az emelt keresztpalló tesztben valamint a szukróz preferencia nem változott, az új környezetben azonban ezeknek az állatoknak az adaptációs képessége is szignifikánsan csökkent. Vércukor, hematokrit érték, a thymus és lép súlya csökkent, valamint a wire suspension (izomerő mérése) ill. rota rod tesztben csökkent teljesítményt nyújtottak. Az újszülöttek ACTH prekursor proopiomelanocortin (POMC) vérszintje magasabb, a hím állatok kortikoszteron szintje emelkedett a kontrollokhoz képest. Mind a morfin, mind az ecstasy kezelés rontotta az *anyai viselkedést*. Naloxon nem befolyásolta a kontroll állatok anyai viselkedését, azonban a morfin-kezelt állatokban az anyai viselkedést csökkentette és nem védte ki a morfin anyai viselkedést gátló hatását. (PL. 44, 45 55, 56). A morfin expozíciónak kitett hím utódokon a morfin fájdalomcsillapító, valamint hyperlokomociót okozó, ill. az opioid antagonistá naloxon hypolokomociót indukáló hatása szignifikánsan csökkent. Nőstény állatokban ilyen változásokat nem tapasztaltunk. *Ecstasy* kezelt anyák hím

utódaiban csökkent az ecstasy hyperlokomociót indukáló hatása. *Dependencia* kialakulását vizsgáltuk a terhesség és laktáció időszakában, krónikusan morfinnal kezelt patkányokon. A morfinelvonás fizikális és viselkedési tüneteit morfin challenge folyamán vizsgáltuk, részben a korai postpartum (anyai viselkedés), részben az elválasztás időszakában (spontán fizikai elvonási tünetek, naloxon precipitáció, motoros aktivitás, szorongás) A morfinnal kezelt anyaállatokban a naloxon kisfokú fizikális elvonási tüneteket váltott ki, pszichés (viselkedési) elvonási tüneteket nem indukált. Ugyanakkor a morfin kezelt anyák csoportjában a morfin rewarding, ill. a naloxon averzív hatása iránti érzékenység jelentősen nőtt, feltehetően az endogén opioid rendszer működésének zavara következtében. Ugyancsak kifejezettebb volt ezekben az anyaállatokban a morfin anyai viselkedést rontó hatása. A morfin expozíció megszűnése után az utód állatokban a naloxon igen kisfokú fizikális elvonási tüneteket váltott ki, míg pszichés (viselkedési) elvonási tüneteket (lokomoció csökkenést) nem indukált. *Vulnerabilitás* kialakulását vizsgáltuk a gesztációs és laktációs periódus alatt morfinnal, ill. MDMA-val kezelt anyák utódain. A morfin kondicionált hely-preferenciát kiváltó hatása a perinatalis morfin expozíciónak kitett 3 hetes utódokban szignifikánsan nagyobb volt és ez a megnövekedett érzékenység felnőtt korban is kimutatható volt. A perinatalis morfin expozíciónak kitett felnőtt állatokban ugyancsak fokozott volt az ecstasy hely-preferenciát kiváltó hatása. A morfin antagonistá naloxon kondicionált hely-averziót provokál, ez a hatás a morfin expozíciónak kitett utódokban szignifikánsan kifejezettebb volt. Hasonlóképpen az ecstasy-val kezelt anyák utódain az ecstasy kondicionált hely-preferenciát kiváltó hatása szignifikánsan nagyobb volt (PL. 4, 17, 20, 21, 37, 38, 44, 45, 47, 55, 56, 58). Mindez arra utal, hogy drog-expozíció a perinatalis időszakban megnöveli a vulnerabilitást, növeli az abúzus kialakulásának valószínűségét.

**IRODALOM (a beszámoló mellékletében a publikációs listában (PL) szereplő saját közleményeket a szövegben a megfelelő sorszámmal jelöltük)**

- Casy, A. F.; Parfitt, R. T. Opioid Analgesics: Chemistry and Receptors; Plenum Press: New York, 1986.
- Freya, E.; Schmidhammer, H.; Latasch, L. 14-Methoxymetopon, a Potent Opioid, Induces No Respiratory Depression, Less Sedation, and Less Bradycardia than Sufentanil in the Dog Anesth. Analg. 2000, 90, 1359–1364
- Fürst, S.; Búzás, B.; Friedmann, T.; Schmidhammer, H.; Borsodi, A. Highly Potent Novel Opioid Receptor Agonist in the 14-Alkoxymetopon Series Eur. J. Pharmacol. 1993, 236, 209–215
- Fürst, S.; Riba, P.; Friedmann, T.; Timar, J.; Al-Khrasani, M.; Obara, I.; Makuch, W.; Spetea, M.; Schütz, J.; Przewlocki, R.; Przewlocka, B.; Schmidhammer, H. Peripheral versus Central Antinociceptive Actions of 6-Amino Acid-substituted Derivatives of 14-O-Methyloxymorphone in Acute and Inflammatory Pain in the Rat J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005, 312, 609–618
- Greiner, E.; Spetea, M.; Krassnig, R.; Schüllner, F.; Aceto, M.; Harris, L. S.; Traynor, J. R.; Woods, J. H.; Coop, A.; Schmidhammer, H. Synthesis and Biological Evaluation of 14-Alkoxymorphinans. 18. N-Substituted 14-Phenylpropyloxymorphinan-6-ones with Unanticipated Agonist Properties: Extending the Scope of Common Structure–Activity Relationships J. Med. Chem. 2003, 46, 1758–1763
- Gyires, K. és Fürst, Zs. A farmakológiai Alapjai Medicina, Budapest, 2011
- McNally, G. P.; Akil, H. Opioid Peptides and Their Receptors: Overview and Function in Pain Modulation. In Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress; Davis, K. L.; Charney, D.; Coyle, J. T.; Nemeroff, C., Eds.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2002; pp 34–46.
- Schmidhammer, H. Opioid Receptor Antagonists. In Progress in Medicinal Chemistry; Ellis, G. P.; Luscombe, D. K.; Oxford, A. W., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1998; 35, 83–132.
- Schütz, J.; Spetea, M.; Koch, M.; Aceto, M. D.; Harris, L. S.; Coop, A.; Schmidhammer, H. Synthesis and Biological Evaluation of 14-Alkoxymorphinans. 20. 14-Phenylpropoxymetopon: An Extremely Powerful Analgesic J. Med. Chem. 2003, 46, 4182–4187
- Spetea, M.; Friedmann, T.; Riba, P.; Schütz, J.; Wunder, G.; Langer, T.; Schmidhammer, H.; Fürst, S. In Vitro Opioid Activity Profiles of 6-Amino Acid Substituted Derivatives of 14-O-Methyloxymorphone Eur. J. Pharmacol. 2004, 483, 301–308
- Stein, C.; Schäfer, M.; Machelska, H. Attacking Pain at its Source: New Perspectives on Opioids Nature Med. 2003, 9, 1003–1008
- Zadina, J. E.; Hackler, L.; Ge, L. J.; Kastin, A. J. A potent and selective agonist for the  $\mu$  opiate receptor. Nature, 1997, 386, 499–502